



Facultad de Farmacia - Universidad de Sevilla

Síntesis enantioselectiva de un nuevo análogo del sulforafano

Belén Chiara Vallejo



Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica

Facultad de Farmacia – Universidad de Sevilla

Trabajo Fin de Grado. Grado en Farmacia

Síntesis enantioselectiva de un nuevo análogo del sulforafano

Trabajo Fin de Grado de tipo Experimental.

Área de Química Orgánica.

Tutoras de trabajo: Prof. Rocío Recio Jiménez / Prof. Inmaculada Fernández Fernández

Belén Chiara Vallejo

Sevilla, Julio 2016

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

c: cuartete

cuant.: cuantitativo

d: doblete

dd: doble doblete

DAG: Diacetón D-glucosa

DIPEA: *N,N* – diisopropiletilamina

DMF: *N,N* – dimetilforfamida

ed: exceso diastereomérico

ee: exceso enantiomérico

EMAR: espectro de masa de alta resolución

equiv.: equivalentes

g: gramos

h: horas

Hz: Hertzios

M: Molar

m: multiplete

MHz: Megahertzios

mL: mililitros

mmol: milimoles

p.f.: punto de fusión

ppm: partes por millón

rd: relación diastereomérica

rdto.: rendimiento

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

ROS: *Reactive Oxygen Species*

s: singulete

SFN: sulforafano

t: triplete

RESUMEN

El sulforafano [(*RS*)-1-isocianato-4-(metilsulfinil)-butano], una molécula quiral caracterizada por contener los grupos funcionales isotiocianato y sulfóxido, es uno de los mayores inductores de las enzimas detoxificantes de fase II a través de la activación del factor de transcripción citoprotector Nrf2, inhibe las enzimas de detoxificación de fase I y además es considerado como uno de los agentes epigenéticos más prometedores en la actualidad.

En los últimos años han aparecido numerosos estudios que atribuyen infinidad de propiedades preventivas y/o curativas al sulforafano (SFN), así, además de prevenir la enfermedad de Parkinson, proteger frente a la radiación ultravioleta, el asma, la rinitis alérgica y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica; tiene propiedades antimicrobianas y antianémicas. Además, y de manera destacada, esta molécula y alguno de sus análogos son capaces tanto de prevenir como de curar diferentes tipos de cáncer, como el de pecho, piel, próstata, colon, cáncer gástrico y cáncer hepático, entre otros.

En este sentido, cabe destacar que el grupo de investigación donde se ha desarrollado este trabajo cuenta con la experiencia y la metodología apropiada para la síntesis del sulforafano y de nuevos análogos en forma enantiopura.

De este modo, en esta memoria se presenta la síntesis de ambos enantiómeros de un nuevo análogo del sulforafano, donde, de entre las diferentes aproximaciones que permiten acceder a un compuesto en forma ópticamente pura, hemos optado por llevar a cabo un proceso de síntesis asimétrica, utilizando para ello la metodología de la DAG como herramienta fundamental en la obtención de las moléculas objetivo en forma enantiopura.

Palabras clave: sulforafano, síntesis asimétrica, metodología DAG, anticanceroso.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Quiralidad, actividad biológica y síntesis asimétrica.....	1
1.2. Sulforafano.....	6
2. OBJETIVOS.....	15
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
3.1. Metodología de la DAG.....	17
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	19
5. CONCLUSIONES.....	23
6. PARTE EXPERIMENTAL.....	25
6.1. Métodos generales.....	25
7. BIBLIOGRAFÍA.....	33

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Quiralidad, actividad biológica y síntesis asimétrica.

La quiralidad es una característica ligada intrínsecamente a la vida (Mislow, 1999). El grado de especialización que existe en la naturaleza es tal, que las biomoléculas están constituidas casi exclusivamente por aminoácidos de la serie L y carbohidratos de la serie D. Por ello, los procesos fisiológicos esenciales son homoquirales, es decir, transcurren con total estereoselectividad, implicando tan sólo un único isómero de todos los estereoisómeros posibles de una molécula biológicamente activa (Bonner, 2000).

Las respuestas fisiológicas que se desencadenan al introducirse un compuesto exógeno en nuestro organismo muestran una alta discriminación quiral, pudiendo producir los distintos estereoisómeros efectos muy diferentes como consecuencia de sus interacciones selectivas con macromoléculas quirales tales como los receptores, las enzimas y los canales iónicos. No es de extrañar, por lo tanto, que los dos enantiómeros de un fármaco presenten la misma actividad terapéutica pero en distinto grado, o que dicha actividad resida únicamente en uno de ellos (Bonner, 2000).

En este sentido, en 1886 Puitti ya apuntaba que mientras la L-Asparagina era insípida, la D-Asparagina tenía un sabor dulce, describiendo así el primer ejemplo de enantiómeros con distintas actividades (Piutti, 1886) (Shallenberger, 1997). Son muchos los ejemplos conocidos actualmente en los que los dos enantiómeros de un fármaco presentan una actividad terapéutica similar pero en distinto grado, o aquéllos en los que la actividad reside únicamente en uno de los enantiómeros, como es el caso de la L- α -metildopa utilizada como antihipertensivo (Delgado y cols., 2002) (figura 1)

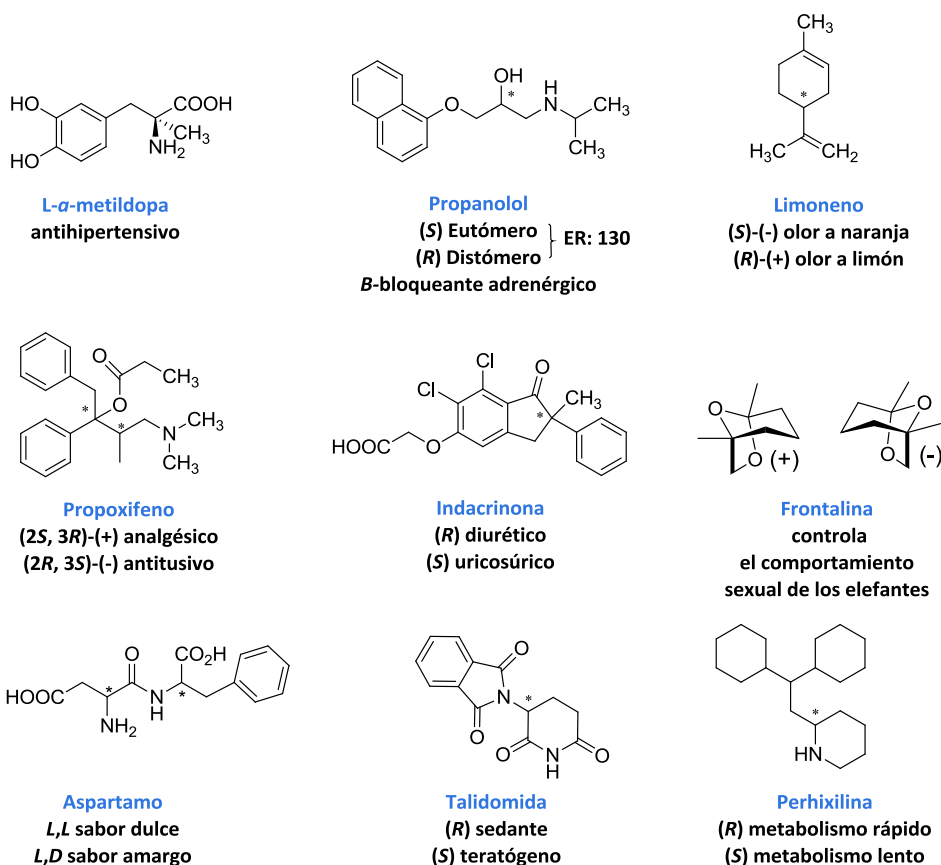


Figura 1

El caso del β-bloqueante adrenérgico Propanolol (figura 1), ilustra la situación más general, al ser uno de los enantiómeros más activo (eutómero) que el otro (distómero). En estos casos se define el denominado cociente eudísmico (ER) como la relación de actividades entre ambos enantiómeros. En otras ocasiones la naturaleza ha desarrollado receptores diferentes para cada enantiómero y así, una molécula como el Limoneno (figura 1) puede oler a limón o naranja dependiendo de la configuración del enantiómero o, como en el caso del Aspartamo, los isómeros pueden tener un sabor diferente (figura 1). En este mismo sentido, la relación de enantiómeros de una feromona puede controlar el comportamiento social en ciertas especies. Así se ha demostrado que los elefantes asiáticos liberan ambos enantiómeros de la Frontalina, una feromona sexual en diferentes proporciones, durante un periodo llamado *musth*, un periodo anual de gran actividad sexual y agresividad. La relación de enantiómeros cambia en función de la edad y juega un papel fundamental para atraer a las hembras en fase folicular y ahuyentar a hembras embarazadas y otros machos (Greenwood y cols., 2005). En algunas ocasiones los enantiómeros de un fármaco pueden presentar actividades de distinto carácter (efecto dual), como en el caso de la Indacrinona, cuyo enantiómero (R) es diurético y el (S) es uricosúrico, por lo que en este caso ambas actividades resultan de utilidad en la aplicación

terapéutica del fármaco. Sin embargo, suele ser más frecuente que no resulte conveniente la asociación de las actividades presentes en ambos enantiómeros, como en el caso del Propoxifeno (figura 1) cuyos enantiómeros tienen propiedades como analgésico y aticonvulsivo. Por último, en ocasiones pueden presentarse problemas de toxicidad o efectos secundarios indeseables asociados a uno de los enantiómeros. A modo de ejemplo, cabe resaltar el caso tristemente famoso de la Talidomida, comercializada en los años 60 en Alemania bajo el nombre de Contergan para aliviar las náuseas de las mujeres embarazadas. Desgraciadamente, años más tarde se demostró que sólo una de las formas enantioméricas del fármaco producía la acción beneficiosa, mientras que la otra causaba malformaciones de las extremidades del feto (Stephens, 2001). Diferentes estudios (Reist y cols., 1998) (Eriksson y cols., 1995) han puesto de manifiesto que la Talidomida se racemiza fácilmente en la sangre y que, por lo tanto, la tragedia no habría sido evitada con la administración del enantiómero (*R*). Este caso ha servido para la toma de conciencia de la importancia de la estereoselectividad sobre la actividad biológica de los medicamentos.

Por otra parte, cabe destacar que los medicamentos racémicos causan problemas, no sólo debido a las posibles diferencias entre actividades biológicas de los enantiómeros antes mencionados, sino también debido a sus diferencias de carácter farmacocinético. En este sentido, el antiarrítmico Perhexilina (figura 1) constituye un buen ejemplo de ello de ello. En los años 80 la administración de Perhexilina en forma racémica provocó la muerte de un gran número de pacientes, debido a la acumulación en el organismo de grandes cantidades del enantiómero (*S*), cuyo metabolismo era mucho más lento que para el enantiómero (*R*) (Rouhi, 2003).

Como consecuencia de todo ello, tras varias décadas de farmacología y terapéutica basadas esencialmente en consideraciones estructurales de tipo bidimensional, donde la farmacopea estaba dominada por racémicos, el comienzo de los años 80 del siglo pasado ha visto surgir la importancia de la estereoquímica (Caldwell, 1999). Este hecho ha sido posible gracias fundamentalmente al desarrollo de nuevas metodologías de obtención de productos enantioméricamente puros y de las técnicas de análisis de enantioselectividad que permiten el control de la presencia de enantiómeros y su dosificación (Branch, 2001).

Hoy en día ha quedado demostrado que la utilización de compuestos estereoquímicamente puros presenta grandes y numerosas ventajas frente al uso de racematos, como consecuencia de: (i) reducir la dosis administrada, (ii) simplificar la relación dosis-efecto, (iii) eliminar el

origen de la variabilidad inter sujeto y, (iv) eliminar la posible toxicidad debida al enantiómero inactivo.

Como consecuencia, el denominado “mercado quiral” se encuentra actualmente en pleno auge y en continuo crecimiento (Stinson, 2002).

De este modo, debido principalmente al reconocimiento por parte de la comunidad científica de la importancia de la relación existente entre la quiralidad y actividad biológica la síntesis asimétrica ha pasado a constituir durante los últimos años una herramienta fundamental dentro de la Química Orgánica para la preparación de compuestos enantioméricamente puros.

Además, actualmente las agencias internacionales de la salud tales como la FDA (*Food and Drug Administration*) americana y la CPMP (*Committee for Proprietary Medicinal Products*) en la Unión Europea, han introducido reglas estrictas y específicas para el control de aquellas sustancias que contengan centros estereogénicos (Stinson, 1992). En este sentido, la legislación actual impone que los fármacos de naturaleza quiral deben ser preparados en sus formas enantioméricamente puras, para poder evaluar de forma separada su interacción con los sistemas biológicos, ya que como hemos comentado anteriormente, las biomoléculas con las que interaccionan los fármacos son también quirales, y por lo tanto, hay que tener en cuenta la operatividad del fenómeno de discriminación quiral en este proceso.

A esta nueva legislación que incentiva el desarrollo de nuevos medicamentos en forma enantiopura, hay que añadir el gran interés del sector farmacéutico por la sustitución de medicamentos actualmente comercializados como racémicos por uno de sus enantiómeros enantiopuro (Renfrey y Featherstone, 2002). Esta estrategia está siendo utilizada actualmente por muchas industrias farmacéuticas con el fin de prolongar la exclusividad de las patentes de medicamentos que están llegando a su fin.

Por todo lo expuesto y dado el número de fármacos que presentan en su estructura uno o varios centros estereogénicos, resulta de sumo interés el desarrollo de métodos de síntesis eficientes para su preparación en forma enantioméricamente pura. Resulta lógico por tanto, que gran parte de la investigación básica en química orgánica durante las tres últimas décadas se haya dedicado al desarrollo de nuevos métodos de síntesis asimétrica (Carlsson y cols., 2002).

En general, existen cuatro aproximaciones para acceder a un compuesto en forma enantiopura: (i) Mediante resolución de un racémico (Stinson, 1999), (ii) Mediante transformaciones de compuestos quirales de origen natural fácilmente accesibles (Hanessian,

1983), (iii) Mediante un proceso de síntesis asimétrica, utilizando un inductor quiral en cantidades estequiométricas (Hoveyda y cols., 1993) y (iv) Mediante un proceso de catálisis asimétrica utilizando catalizadores quirales orgánicos, organometálicos o biológicos (Movassaghi y Jacobsen, 2002).

Con independencia de la aproximación utilizada, una síntesis asimétrica ideal debe permitir obtener con alto rendimiento químico y a voluntad los dos posibles enantiómeros de un determinado producto en forma enantiopura y, a ser posible, sin modificar la naturaleza del inductor quiral (síntesis enantiodivergente), (Hudlicky, 1993).

Es precisamente en este área, el de la síntesis asimétrica, donde el grupo de investigación en el que se ha desarrollado este Trabajo de Fin de Grado (TFG), ha contribuido de forma más importantes (Khiar y cols., 2000). En concreto, una de sus aportaciones más significativas ha consistido en el desarrollo de una nueva metodología de síntesis que permite obtener ambos enantiómeros de una amplia gama de sulfóxidos en forma enantiopura. Los sulfóxidos han sido utilizados con gran éxito como inductores de quiralidad en síntesis asimétrica, gracias fundamentalmente a las características estéricas y electrónicas del grupo sulfinilo. Aunque la utilidad sintética de este grupo sulfinilo ha quedado patente en su aplicación en la síntesis asimétrica de productos naturales de alta complejidad, el interés por el desarrollo de métodos que permitan obtener sulfóxidos de forma estereoselectiva no radica únicamente en su uso como inductores quirales, sino también porque existe un gran número de compuestos de interés terapéutico que presentan en su estructura un grupo sulfinilo quiral. Algunos de ellos se encuentran representados en la figura 2 e incluyen actividades farmacológicas muy diferentes como antibiótico, inmunosupresor, o psicoestimulante entre otros. Entre estos sulfóxidos cabe destacar el sulforafano, un isotiocianato de estructura muy sencilla y con un enorme potencial terapéutico como expondremos a continuación.

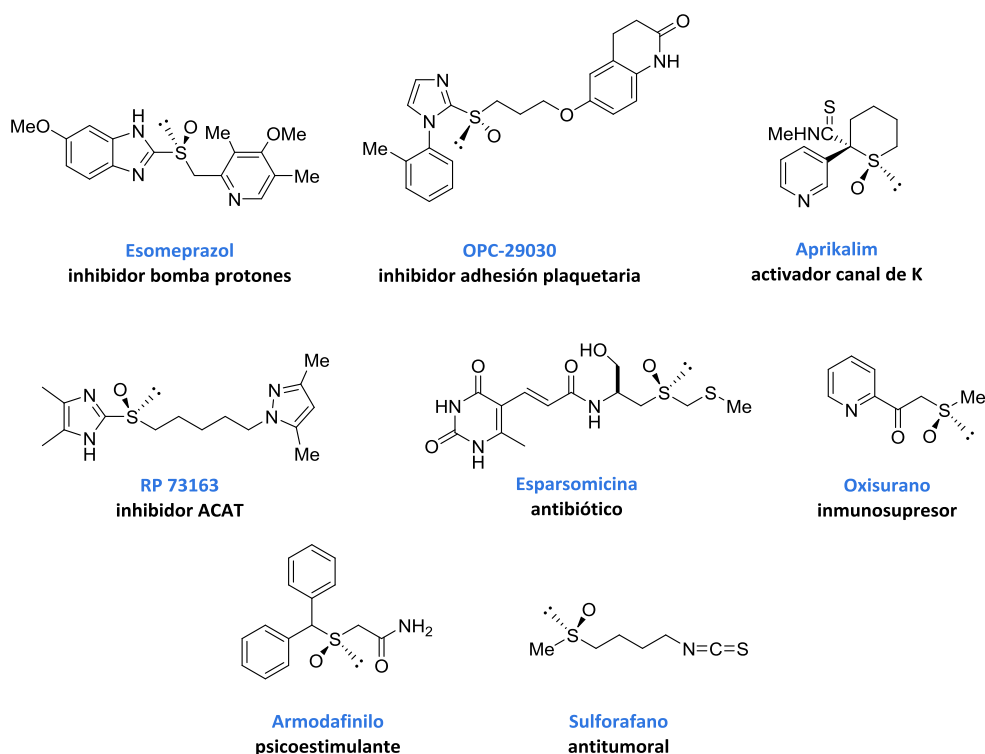


Figura 2. Algunos ejemplos de sulfóxidos quirales de interés terapéutico.

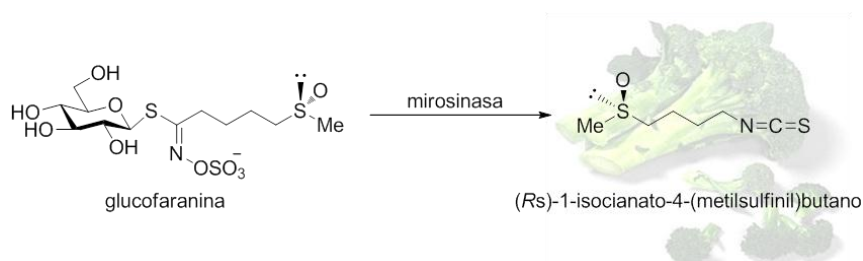
1.2 Sulforafano

Diversos estudios epidemiológicos y clínicos han aportado evidencias concluyentes sobre el hecho de que aquellas poblaciones con una dieta rica en crucíferas, tales como el brócoli, la coliflor, la lombarda, las coles de Bruselas, o la col son menos propensas a desarrollar determinados tipos de cánceres como los del tracto gastrointestinal, respiratorio (Beecher, 1994), de pulmón (Spitz y cols., 2000), vejiga (Zhao y cols., 2007), pecho (Ambrosone y cols., 2004), próstata (Joseph y cols., 2004), linfoma no Hodgkin (Zhang y cols., 2000) y cáncer colorrectal (Lin y cols., 1998).

La prevención de la carcinogénesis y el efecto quimio-terapéutico que proporciona este tipo de dietas han sido atribuidos al alto contenido en compuestos fitoquímicos que se caracterizan estructuralmente por contener un isotiocianato como grupo funcional (Conaway y Yang, 2002) (Fenwick y Heaney, 1983).

Estos isotiocianatos no son producidos como tal por la planta, sino que son el resultado de la acción enzimática de la mirosinasa (una tioglicosidasa) sobre glucosinolatos naturales como la glucofaranina (Wittstock y Halkier, 2002). La mirosinasa cataliza la hidrólisis de los enlaces

tioglicosídicos conduciendo a intermedios inestables, que a pH fisiológico sufren degradaciones de tipo Lossen dando lugar a los correspondientes isotiocianatos, como el (*R*)-1-isocianato-4-(metilsulfinil)-butano, conocido como sulforafano (SFN) (esquema 1) (Gil y Macleod, 1980).



Esquema 1

Los glucosinolatos se hidrolizan cuando el tejido del vegetal se rompe como consecuencia de un daño mecánico, entonces la enzima tioglicosidasa o mirosinasa se pone en contacto con el sustrato y da lugar a nitrilos, metilisotiocianatos, metilnitrilos e isotiocianatos entre otros, que son los responsables del aroma y sabor típicos de las brassicáceas. Los glucosinolatos intactos tienen una actividad biológica limitada y solo aumentan su actividad cuando son hidrolizados a isotiocianatos, como es el caso del SFN, aunque también pueden tener efectos tóxicos, dependiendo de la naturaleza del glucosinolato y las condiciones de hidrólisis. Por otra parte, los glucosinolatos y sus productos de degradación pueden servir a las plantas como agentes disuasorios de herbívoros o como atrayentes de insectos para favorecer la polinización.

El SFN es un sulfóxido quiral estructuralmente sencillo, aislado por primera vez en 1992 a partir de extractos de brócoli (Zhang y cols., 1992). Se puede decir, que es el isotiocianato más estudiado y muchos de estos estudios atribuyen los efectos beneficiosos para la salud de las crucíferas a su alto contenido en SFN (Fahey y cols., 1997).

Su elevada actividad como agente quimiopreventivo se encuentra ampliamente documentada (Juge y cols., 2007) y es considerado por el Instituto Nacional del Cáncer de los EE.UU. como uno de los cuarenta agentes anticancerosos más prometedores (Kelloff y cols., 2000). Se ha descrito que ayuda a la prevención del cáncer de colon y estudios clínicos y preclínicos recientes han confirmado esta misma actividad quimiopreventiva en mujeres con riesgo de padecer cáncer de pecho (Cornblatt y cols., 2007). También existen evidencias sobre la actividad del SFN como agente dietético preventivo contra el desarrollo de cáncer gástrico por acción de *Helicobacter pylori* (Yanaka y cols., 2009) (Fahey y cols., 2002).

Además de estos efectos de tipo preventivo, el SFN y sus análogos también son eficaces en el tratamiento de distintos tipos de cánceres ya establecidos. Esta actividad anticancerosa se debe en parte a que son capaces de inducir apoptosis celular gracias a la presencia del grupo isotiocianato (Myzak y Dashwood, 2006) (Xu y cols., 2007). Así lo confirman estudios realizados en líneas celulares humanas de cáncer de colon (Kim y cols., 2010), leucemia (Choi, 2008), páncreas y pulmón, entre otros (Pham y cols., 2004) (Chiao y cols., 2002) (Singh y cols., 2009) (Hanlon y cols., 2009). En concreto, se ha demostrado que el (R) sulforafano inhibe el crecimiento de células humanas de cáncer de próstata tanto *in vitro* como *in vivo* y retrasa el desarrollo de este tipo de cáncer en modelos de ratón transgénico (Kim y Singh, 2009).

En otros campos diferentes al de la carcinogénesis, el SFN y derivados pueden proteger frente a determinadas dolencias cardíacas además de contribuir al buen funcionamiento del sistema inmune. De hecho, debido a que se le considera como un antioxidante indirecto, el SFN es capaz de prevenir o tratar infinidad de enfermedades que cursen a través de un proceso oxidativo.

Por ejemplo, se ha demostrado, que el SFN previene de manera eficaz el incremento de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y disminuye la actividad de algunas enzimas oxidantes favorecidas por la acción del cisplatino (Guerrero-Beltrán y cols., 2010), evitando así el daño renal ocasionado en este tipo de tratamientos (Ragheb y cols., 2009).

Recientemente se ha puesto de manifiesto que el SFN ejerce un efecto protector frente a la radiación ultravioleta, evitando así el daño solar, la degeneración causada por ROS y el desarrollo de cáncer de piel. Es muy importante destacar que el SFN, a diferencia de las cremas solares, no evita el impacto de la luz solar contra la piel. Esto quiere decir que no interfiere en la síntesis de vitamina D por el organismo lo cual es de suma importancia ya que un déficit en esta vitamina conduce al incremento del riesgo de padecer cáncer de mama, de próstata, depresión, y desórdenes del tejido óseo como la osteoporosis.

También, el estrés oxidativo y la formación de ROS por parte de la mitocondria es un hecho común en la disfunción de las células endoteliales en hiperglucemias (Nyengaard y cols., 2004), comprobándose que el pre-tratamiento con SFN bloquea el desarrollo de diabetes tipo I en ratones tratados con estreptozina (inductor de diabetes de tipo I). Además, este pre-tratamiento, es capaz de restablecer la respuesta insulínica normal a la glucosa en islotes pancreáticos de rata tratados con citoquina (Song y cols., 2009) (Beyer y cols., 2008).

La actividad antioxidante indirecta del SFN protege las células retinales contra el daño fotooxidativo y la pérdida de visión que se produce como consecuencia de la degradación macular relacionada con la edad (Gao y Talalay, 2004).

Este fitoquímico también puede mitigar el efecto nocivo de las partículas contaminantes que existen en el ambiente como consecuencia de la alta polución (Ritz y cols., 2007). Esto demuestra el gran potencial del SFN como una nueva estrategia terapéutica para los desórdenes respiratorios inducidos por oxidantes. De hecho se ha comprobado que puede ser utilizado para proteger contra la inflamación respiratoria que causa enfermedades como el asma, la rinitis alérgica y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). Es capaz de inhibir la desgranulación mastocitaria, por lo que pueden ser utilizados como medicamentos, alimentos naturales y cosméticos para el tratamiento de enfermedades atópicas, incluyendo la rinitis atópica, conjuntivitis y dermatitis.

La toxicidad de radicales libres, el estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial componen los mecanismos patológicos clave en las enfermedades neurodegenerativas (Beal, 2009), la inclusión del SFN en la alimentación de una mosca modelo en la enfermedad de Parkinson ha dado lugar a la supresión de la pérdida neuronal y la protección frente a esta enfermedad (Trinh y cols., 2008).

El accidente cerebro-vascular es la tercera causa de muerte en el mundo occidental. Un pre-tratamiento sistémico con SFN o dietas que contienen este fitoquímico reducen significativamente el volumen de infartos cerebrales tras una isquemia focal (Zhao y cols., 2006), proporcionando neuroprotección en la hipoxia neonatal estudiada en un modelo de rata (Ping y cols., 2010).

Por otro lado, un estudio *in vitro* con cardiomiocitos neonatales de rata, mostró que el tratamiento a largo plazo con SFN tiene un efecto cardioprotector, demostrándose que el consumo de SFN a través del brócoli también disminuye el estrés oxidativo tanto en machos como en hembras de rata hipertensas propensas a sufrir accidentes cerebro-vasculares y mejora la presión sanguínea además de disminuir la inflamación en todos los tejidos examinados durante el ensayo (tejido cardíaco, arterial, renal y SNC) (Noyan-Ashraf y cols., 2005) (Xu y cols., 2006).

El SFN también es capaz de proteger a los astrocitos frente a la muerte derivada de la privación de oxígeno y glucosa, y ha demostrado su capacidad para mejorar la función cognitiva en ratas tras un accidente cerebro-vascular (Dash y cols., 2009). Todas estas observaciones indican que

el SFN es una prometedora aproximación a la neuroprotección después de una isquemia cerebral.

Recientemente se ha demostrado que el SFN tiene una actividad anti acetilcolinesterasa y puede ser útil por tanto en el tratamiento de los síntomas en la enfermedad del Alzheimer (Mukherjee y cols., 2007).

Otra de las propiedades que se les atribuye a estos isotiocianatos derivados del SFN es la actividad antimicrobiana frente a bacterias gram positivas, gram negativas y levaduras (Hud y cols., 2004).

Por último, y de manera muy destacada, cabe mencionar que recientemente el SFN ha abierto las puertas de un futuro muy esperanzador para el tratamiento de enfermedades raras como el autismo y el síndrome de progeria de Hutchinson Gilford. (Gordon y cols., 2015).

Como hemos visto, son muchas las aplicaciones de este producto, siendo quizás una de las más importantes para la prevención y tratamiento del cáncer, pero cabe preguntarse ¿Cómo una única molécula es capaz de prevenir enfermedades de tan diversa patología?, la clave la encontramos en su mecanismo de acción.

El estudio de las bases moleculares del mecanismo de acción del SFN parece indicar que este producto actúa de manera indirecta como agente antioxidante.

Se sabe que el metabolismo de muchas sustancias juega un papel muy importante en el inicio de procesos cancerosos. Normalmente este proceso metabólico se lleva a cabo mediante las enzimas de fase I y de fase II (Woolf y Jordan, 1987).

De hecho, el SFN es el mayor inductor de origen natural del metabolismo de fase II tanto en animales como en humanos, y además es capaz de inhibir las enzimas de detoxificación de fase I (figura 3)

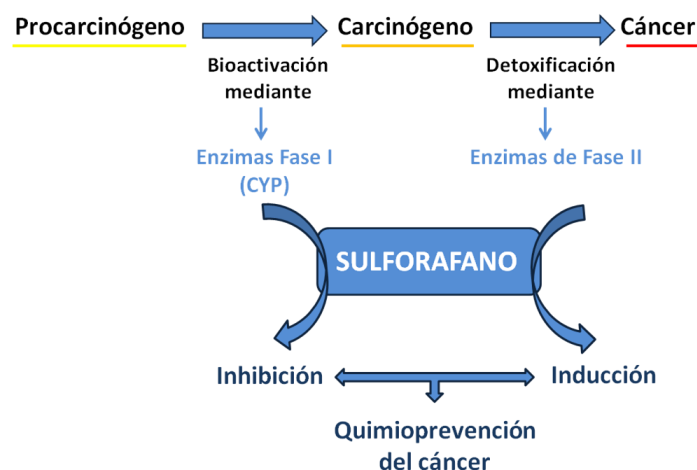


Figura 3. Esquema representativo del mecanismo de acción del SFN a través de las enzimas de fase I. (Recio, 2012)

Por ejemplo, se ha demostrado que el SFN puede inhibir la actividad de las enzimas de fase I CYP1A1 y CYP1A2 en células humanas de hígado (Skupinska y cols., 2009). Teniendo en cuenta que el paso clave para la carcinogénesis provocada por hidrocarburos policíclicos aromáticos (como el benzopireno presente en el humo del tabaco) es su biotransformación a los correspondientes derivados oxigenados mediante la acción de estas dos enzimas, podemos decir que el SFN actúa como quimiopreventivo inhibiendo el metabolismo de éstas y la aparición de muchas otras sustancias tóxicas (Maheo y cols., 1997).

En cuanto al metabolismo de fase II, el SFN es capaz de activar el factor de transcripción citoprotector Nrf2 (figura 4). Contrariamente a los antioxidantes directos, en los que cada molécula sólo es capaz de neutralizar a otra molécula de un radical libre y se destruyen en el proceso, el efecto antioxidante del sulforafano es más duradero y eficaz ya que estimula las células para protegerse frente a cualquier agente oxidante o cancerígeno. Es decir, una única molécula de SFN puede dar lugar a la expresión de infinidad de moléculas antioxidantes utilizando la maquinaria normal de transcripción celular.

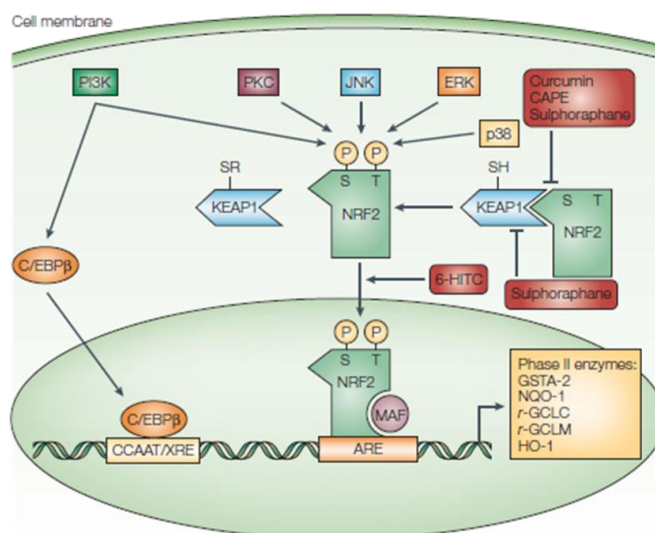


Figura 4. Activación transcripcional a través del factor Nrf2. (Surh, 2003)

Aunque los primeros estudios se centraron principalmente en esta acción del SFN como inductor de las enzimas de detoxificación de fase II, estudios más recientes indican que el SFN puede actuar además por otros mecanismos, entre los que se encuentran, como hemos dicho, la inhibición de las enzimas de fase I, la inducción de la apoptosis, el bloqueo del ciclo celular y el efecto antiinflamatorio (Juge y cols., 2007). Todos estos factores deben interaccionar de manera conjunta para reducir el riesgo de la carcinogénesis, dotando además en algunos casos al SFN de una actividad anticancerosa.

Actualmente, se reconoce que el SFN es capaz de regular la expresión génica vía epigenética a través de múltiples mecanismos, convirtiéndolo sin lugar a dudas en uno de los agentes epigenéticos con mayor proyección en el tratamiento de múltiples enfermedades.

A partir de 2001, con la finalización del Proyecto Genoma Humano, la epigenética ha revolucionado la investigación en el tratamiento del cáncer en los últimos años y está considerada como un puente entre alimentación y salud.

De manera sencilla, la epigenética se puede considerar como el conjunto de modificaciones químicas que, como si fueran interruptores, pueden activar o silenciar determinados genes.

Se ha podido constatar que los hábitos de nuestra vida (la alimentación, el ejercicio, la medicación, las enfermedades, e incluso factores emocionales y psicológicos...) afectan a nuestro epigenoma, memorizando un legado que incluso podría ser transmitido a nuestras generaciones. Por ejemplo, diversos estudios han demostrado que los gemelos son epigenéticamente similares cuando son jóvenes. Sin embargo, aparecen diferencias

considerables en el patrón de metilación de su ADN a medida que los gemelos envejecen, efecto conocido como “desviación epigenética”, reflejando que la exposición al entorno afecta claramente el patrón epigenético en los individuos y se transmite incluso a generaciones posteriores (Fraga y cols., 2005).

En general, han sido descritos 4 mecanismos generales que contribuyen a la regulación de la expresión génica, que son: la metilación del ADN, la modificación química de las colas de las histonas, los microARNs (miARNs) y la organización espacial de la cromatina dentro del núcleo (figura 5).

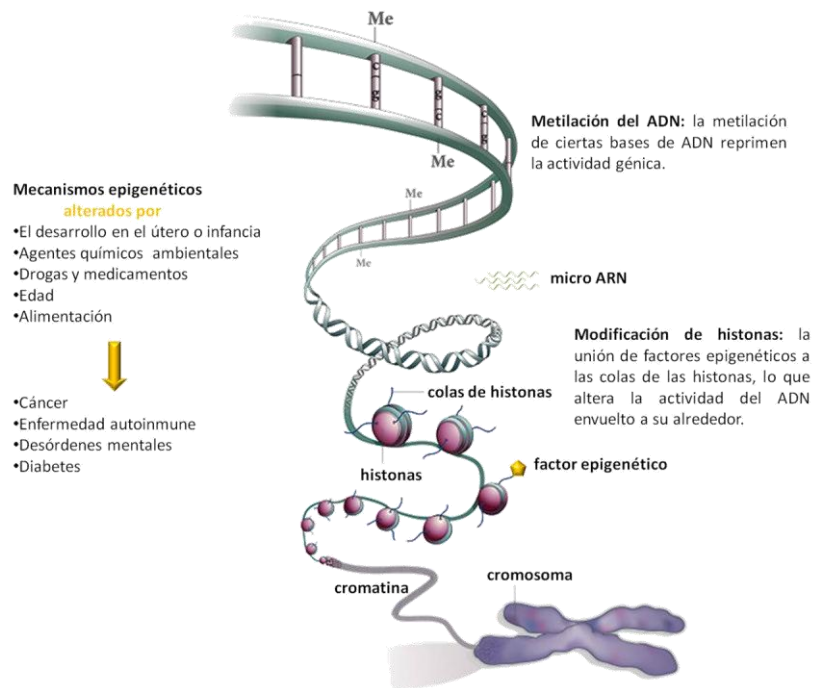


Figura 5. Mecanismos epigenéticos (Recio, 2012).

En este sentido, recientemente se ha demostrado que el SFN también es capaz de inducir efectos quimioprotectores y antiproliferativos del cáncer vía epigenética. Concretamente, el SFN tiene la capacidad de influir en las histonas desacetilasas (HDAC), favoreciendo así la transcripción de genes implicados en el control del ciclo celular. En un estudio reciente se evidencia cómo este efecto epigenético (inhibición de las HDAC) del sulforafano se dirigía selectivamente a las células de hiperplasia benigna y células de cáncer de próstata, mientras que no afectaba a las células de próstata normales (Clarke y cols., 2011). En cáncer de próstata el SFN es capaz de actuar como un modular epigenético alterando el estado de metilación de la región promotora de la ciclina D2 influyendo así en la regulación del ciclo celular (Hsu y cols., 2011). También se ha demostrado que el SFN modula la epigenética de tal modo que es capaz

de inhibir la telomerasa transcriptasa inversa humana (*hTERT*, subunidad catalítica de la telomerasa) acortando así la vida celular en el cáncer de mama (Meeran y cols., 2010).

Todos estos datos sugieren que el SFN puede regular la expresión génica vía epigenética a través de múltiples mecanismos, convirtiéndolo sin lugar a dudas en uno de los agentes epigenéticos con mayor proyección en el tratamiento de múltiples enfermedades, sobre todo teniendo en cuenta que en los estudios llevados a cabo hasta el momento no se han descrito efectos adversos en su aplicación.

Teniendo en cuenta el enorme potencial farmacológico que posee el SFN, una de las líneas de investigación desarrolladas en los últimos años por el grupo de investigación donde se ha llevado a cabo este TFG se ha centrado en el desarrollo de una metodología fácil y eficaz para la síntesis enantioselectiva de ambos enantiómeros del sulforafano y de nuevos análogos y la estabilización de todos estos productos a través de sistemas nanométricos (Elhalem y cols., 2014) (Khiar y cols., 2009).

En estos estudios, se ha demostrado que existe una clara influencia de la estereoquímica del azufre sulfinílico del SFN sobre su actividad biológica. Además, se pone de manifiesto que existe una influencia importante de la naturaleza del sustituyente del azufre sulfinílico sobre la actividad, así como de la longitud de la cadena carbonada entre el azufre sulfinílico y el grupo isotiocianato.

De este modo, el estudio de diferentes análogos permitió determinar que, en general, la actividad es superior en los alquil que en los arilsulfonil derivados, observándose una disminución de dicha actividad al aumentar el tamaño del grupo alquilo sustituyente en el azufre, y que, una mayor longitud de cadena entre el grupo sulfonilo y el isotiocianato implica un aumento en la actividad (Khiar y cols., 2009).

Por otro lado, el estudio de análogos de cadena polioxygenada de diferente longitud demostró que el cambio en la naturaleza de la cadena carbonada del SFN daba lugar a análogos más hidrosolubles y con mayor biodisponibilidad y, por otra parte, reforzó la idea de que una mayor longitud de la cadena está directamente relacionada con un incremento en la actividad biológica a través del factor Nrf2. (Khiar y cols., 2013)

2. OBJETIVOS

Teniendo en cuenta estos antecedentes, en esta Memoria nos planteamos como objetivo general la síntesis de ambos enantiómeros de un nuevo análogo del sulforafano, **1(R)** y **1(S)**, donde los sustituyentes en el azufre sulfinílico son un grupo metilo y una cadena carbonada de 12 átomos de carbono de longitud (figura 5).

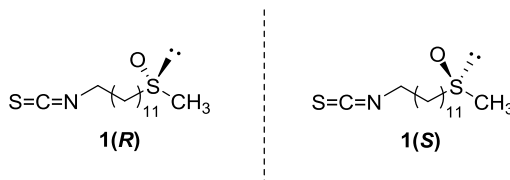


Figura 5. Homólogos del sulforafano: (*R*)- y (*S*)-1-isotiocianato-12-(metilsulfinil)dodecano, **1(R)** y **1(S)**.

Para ello, nos planteamos los siguientes objetivos parciales:

2.1. Síntesis diastereodivergente de dos nuevos sulfinatos, epímeros en el azufre, como agentes sulfinilantes precursores de ambos enantiómeros del nuevo homólogo del sulforafano.

2.2. Transformación de los sulfinatos sintetizados en los correspondientes sulfóxidos de forma estereoselectiva, para acceder a ambos enantiómeros de la molécula objetivo.

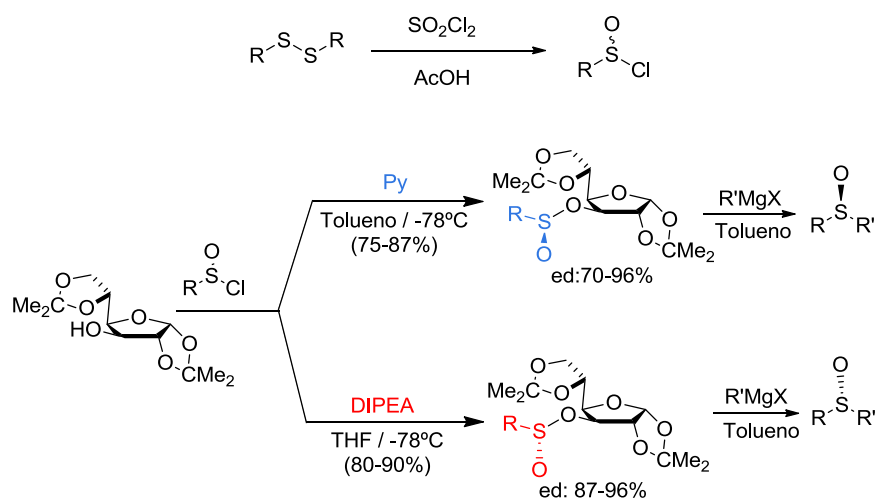
3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Metodología de la DAG

A principio de los 90, el grupo de investigación donde se ha llevado a cabo este TFG desarrolló la metodología de la DAG que ha demostrado ampliamente su aplicabilidad para la síntesis enantiodivergente de ambos enantiómeros de un gran número de dialquil, diaril y aquilarilsulfóxidos y por consiguiente, constituye uno de los métodos más generales y eficientes para la síntesis enantiodivergente de ambos enantiómeros de sulfóxidos de interés biológico o sintético (Fernández y cols. 1992) (Khar y cols., 2000) (Fernández y cols., 2008).

En concreto, la reacción del derivado de la D-glucosa (actualmente el azúcar más barato en el mercado), diacetón-D-glucosa, con un cloruro de alcano- o arenosulfinilo a -78°C , en presencia de una base, permite obtener con altos rendimientos químicos y elevada diastereoselectividad el correspondiente sulfinato de DAG con la configuración deseada en el azufre, seleccionando de forma adecuada la naturaleza de la base empleada. En presencia de piridina se obtiene mayoritariamente el sulfinato de configuración R_S y cuando se utiliza DIPEA en lugar de piridina se obtiene mayoritaria o exclusivamente el sulfinato de configuración contraria S_S en el azufre sulfinílico (esquema 2).

Otro rasgo importante de la metodología de la DAG es que transcurre mediante un proceso de resolución cinética dinámica de los cloruros de sulfinilo de partida. Adicionalmente, los sulfinatos de DAG han resultado ser unos excelentes agentes sulfinilantes, y su reacción con un derivado organometálico o nucleófilo adecuado rinde los correspondientes sulfóxidos de forma estereoselectiva mediante un proceso que transcurre con inversión de la configuración en el azufre (esquema 2).



Esquema 2. Metodología de la DAG

Por lo tanto, teniendo en cuenta que nuestras moléculas objetivos, como homólogos del (*R*)- y (*S*)-sulforafano tienen estructura de metil alquil sulfóxidos, esta metodología resulta adecuada para abordar su síntesis estereoselectiva.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Habiendo propuesto como objetivo sintético de este TFG la preparación estereoselectiva de los análogos del sulforafano (*R*)- y (*S*)-1-isotiocianato-12-(metilsulfinil)dodecano, **1(R)** y **1(S)**, diseñamos una ruta sintética cuya etapa clave se basa en la síntesis del sulfinato precursor adecuado mediante la aplicación de la metodología de la DAG.

Como se desprende de la figura 6, un análisis retrosintético de nuestras moléculas objetivo **1(S)** y **1(R)** muestra que pueden obtenerse por transformación sencilla de la correspondiente azida **2(R)** y **2(S)**, respectivamente, cuya síntesis puede abordarse siguiendo dos posibles rutas alternativas. La ruta A, que implica la síntesis del metanosulfinato de DAG para introducir posteriormente la cadena carbonada, y la ruta B que se basa en la síntesis del azidoalcanosulfinato y su posterior transformación en el metilsulfóxido por tratamiento con haluro de metilmagnesio. En nuestro caso optamos por seguir la ruta sintética basada en la segunda aproximación (ruta B) (figura 6).

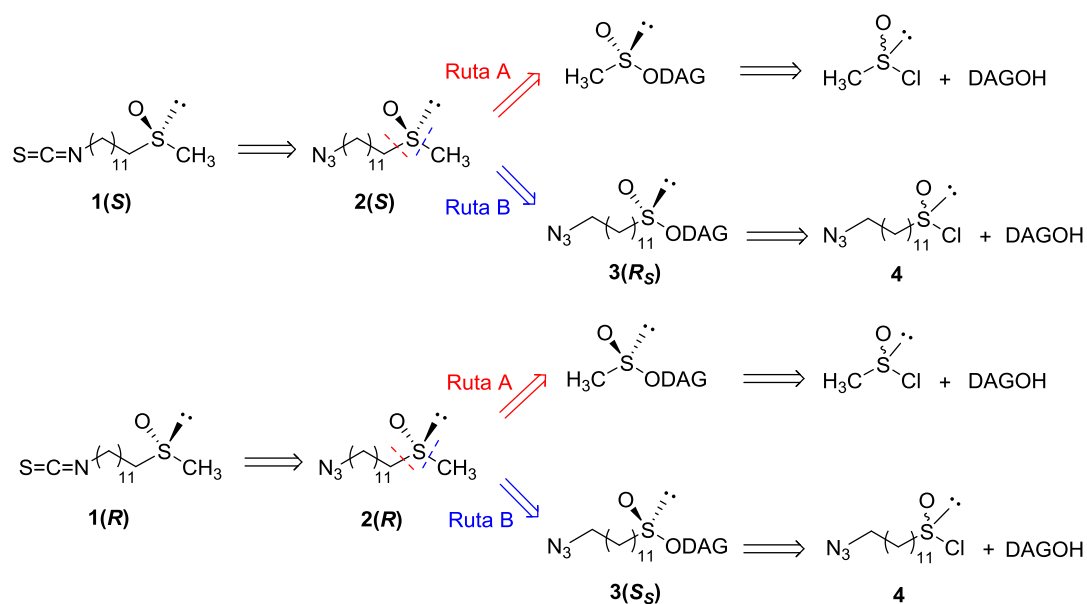
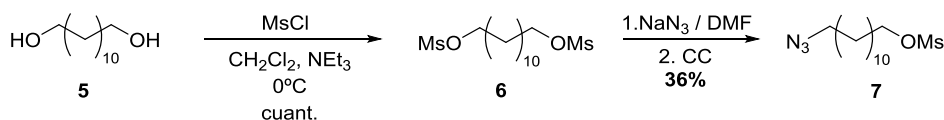


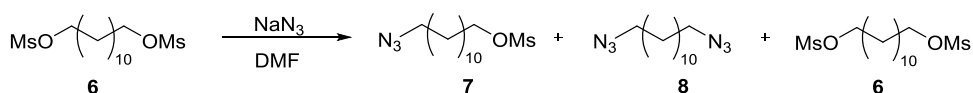
Figura 6. Rutas A y B de los esquemas retrosintéticos de **1(R)** y **1(S)**.

Para ello, abordamos en primer lugar la preparación del correspondiente cloruro de sulfinilo, seleccionando el dihidroderivado de longitud adecuada, el dodecano-1,12-diol **5**, como materia de partida. El tratamiento de **5** con 2 equivalentes mol de cloruro de mesilo en presencia de trietilamina como base rinde cuantitativamente el correspondiente derivado dimesilado **6** que, mediante tratamiento con una cantidad equimolar de azida sódica en dimetilformadida, permite obtener la azidamonomesilada **7** (esquema 3).



Esquema 3

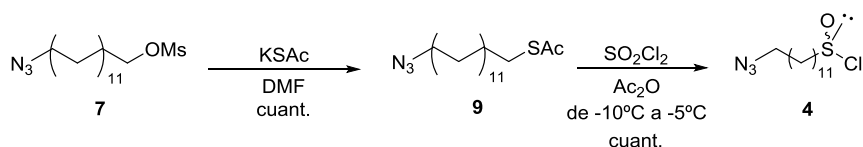
Hay que destacar que la segunda etapa del esquema 3 consiste en una reacción de sustitución nucleofílica de un grupo mesilato de **6** por el nucleófilo azida y, teniendo en cuenta que la reacción se lleva a cabo con una cantidad equimolecular de nucleófilo y en **6** existen dos grupos mesilatos idénticos, necesariamente se obtiene junto con el producto deseado **7**, el derivado disustituido **8** y el producto de partida **6**, en proporción 2:1:1 respectivamente, como corresponde a una distribución de tipo estadístico, y cuya separación se lleva a cabo fácilmente mediante cromatografía en columna (esquema 4). De esta forma se aísla **7**, tras purificación, con un rendimiento químico del 36%, frente al teórico 50% con que podría obtenerse como rendimiento máximo.



(Relación estadística de productos **7:8:6** = 2:1:1)

Esquema 4

El tratamiento de la azida monomesilada **7** con tioacetato de potasio rinde cuantitativamente el producto de sustitución **9**, que mediante tratamiento con cloruro de sulfinilo, en diclorometano y en presencia de anhídrido acético, a -10°C, permite obtener el cloruro de 12-azidododecano-1-sulfinilo **4**. En esta etapa es importante controlar que la adición del cloruro de sulfinilo tenga lugar a -10°C, para dejar luego subir la temperatura hasta -5°C (esquema 5)



Esquema 5

De esta forma, en tan sólo 4 etapas se obtiene de forma fácil y a partir de reactivos económicamente asequibles el cloruro de sulfinilo deseado.

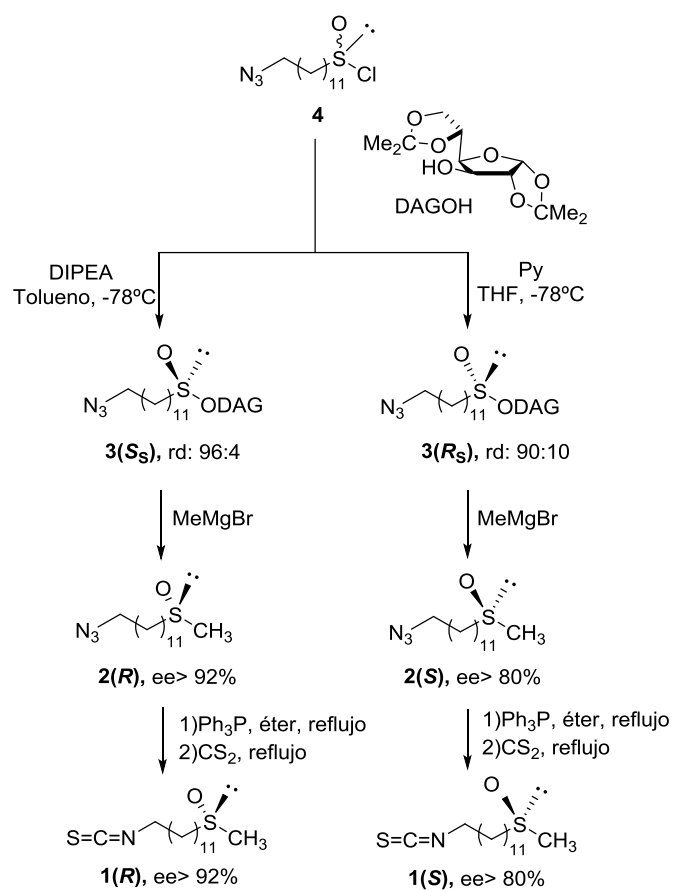
El cloruro de sulfinilo **4** así obtenido, se utiliza inmediatamente y sin previa purificación en la siguiente reacción por tratamiento con DAG, como alcohol quiral secundario, en presencia de

una base, para la síntesis diastereoselectiva de los dos posibles sulfinatos, **3(R_S)** y **3(S_S)**, epímeros en el átomo de azufre.

La síntesis diastereoselectiva de estos sulfinatos se llevó a cabo aplicando la metodología de la DAG, descrita anteriormente. Para ello, el cloruro de sulfinilo **4** se hizo reaccionar con diacetón-D-glucosa a -78°C, en presencia de la base adecuada. Utilizando DIPEA como base y tolueno como disolvente se obtuvo el sulfinato de DAG de configuración *S* en el azufre, **3(S_S)**. La diastereoselectividad de la reacción pudo determinarse fácilmente mediante análisis del espectro de ¹H RMN del crudo de reacción, ya que ambos diastereoisómeros presentan desplazamientos y patrones de acoplamiento diferentes para sus núcleos (ver parte experimental). El sulfinato **3(S_S)** se obtuvo con una r.d. de 96:4 a favor del diastereoisómero *S*. Cuando la reacción se llevó a cabo en presencia de piridina, en THF como disolvente, se obtuvo mayoritariamente el sulfinato de configuración *R* en el azufre, **3(R_S)**, determinándose al igual que en el caso anterior la diastereoselectividad que resultó ser algo inferior a la anterior, ya que ambos diastereoisómeros se obtuvieron con una proporción de 90:10 (esquema 6).

El tratamiento posterior con bromuro de metil magnesio, en tolueno a 0°C, rindió los metilsulfóxidos correspondientes, **2(S)** y **2(R)**. La reacción transcurre de forma estereoselectiva, con inversión de la configuración en el azufre, y con buenos rendimientos químicos y, al tratarse de enantiómeros, ambos compuestos presentan características espectroscópicas idénticas, presentando signos opuestos del valor de rotación específica.

Por último, la transformación del grupo azida en isotiocianato se llevó a cabo mediante un proceso *one-pot* por reacción con trifenilfosfina (Staudinger y Meyer, 1919), en éter, a reflujo y tratamiento posterior con disulfuro de carbono (Molina y cols., 1982) (esquema 6)



Esquema 6

De esta forma se han preparado los homólogos del sulforafano **1(R)** y **1(S)**, con una cadena carbonada de 12 átomos de C de longitud y con una enantioselectividad que debe ser igual o superior a la de sus sulfinatos de DAG precursores (ee \geq 92% y 80%, respectivamente).

5. CONCLUSIONES

- Se han preparado ambos enantiómeros del homólogo del sulforafano con una longitud de la cadena carbonada de 12 átomos de carbono, **1(R)** y **1(S)**. Para ello, se ha aplicado una secuencia de síntesis que consta de tan sólo 7 etapas, utilizando dodecano-1,12-diol como sustancia de partida económicamente asequible.
- La metodología de la DAG ha demostrado ser un procedimiento adecuado para llevar a cabo la ruta propuesta al permitirnos preparar de manera diastereodivergente los sulfinatos **3(R_S)** y **3(S_S)** precursores de ambos sulfóxidos enantiómeros, con ed del 80 y 92% respectivamente, a partir de un mismo cloruro de sulfinilo **4**, siendo ésta la etapa clave de nuestra ruta sintética ya que en ella se genera la quiralidad adecuada del azufre.
- Por el momento se han obtenido los productos finales **1(R)** y **1(S)** como escalémicos muy enriquecidos en cada uno de los enantiómeros y cabe esperar que mediante recristalización en las condiciones y con el disolvente adecuados finalmente se pueda obtener cada enantiómero en forma enantiopura. Actualmente se está llevando a cabo esta última tarea.

6. PARTE EXPERIMENTAL

6.1. Métodos generales

Todas las reacciones se han llevado a cabo bajo atmósfera de argón usando material de vidrio, secado en estufa y con disolventes anhidros. Los disolventes se secaron con tamiz molecular de 4Å, previamente activado en microondas y a vacío.

El seguimiento de las reacciones se ha efectuado por cromatografía en capa fina empleando cromatofolios de gel de sílice tipo 60F₂₅H de un espesor de capa de 0,2 mm (Merck). El análisis de las placas se ha llevado a cabo en una lámpara de UV de 254/365 nm y mediante revelado con ácido fosfomolibdico o vainillina.

La purificación y separación de los productos de las reacciones se ha realizado, en su mayor parte, mediante cromatografía en columna bajo presión (cromatografía flash), utilizando como fase estacionaria gel de sílice de tipo 60, con un tamaño de partícula de 35-70 micras. En cada caso se indica el eluyente empleado, así como las proporciones de los disolventes en volumen-volumen.

Los puntos de fusión se han determinado en un aparato Gallemkamp en tubos capilares abiertos y no están corregidos.

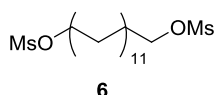
Las rotaciones ópticas $[\alpha]^{20}_D$ se han determinado a 20°C en un polarímetro Perkin-Elmer 241MC, empleando luz amarilla de sodio ($\lambda=589$ nm) y celdas de 1 dm de longitud. En cada caso se indica el disolvente utilizado así como la concentración (C en g/100 mL).

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) se han realizado, en general, a temperatura ambiente utilizando como disolventes CDCl₃. Los desplazamientos químicos (en ppm) se han referido a la señal residual de disolvente utilizado.

Los espectros de ¹H RMN y ¹³C RMN se han registrado en los aparatos Bruker AMX₅₀₀ y Bruker Advance DRX₅₀₀. En cada caso se indican los desplazamientos químicos en la escala δ (ppm), el número de protones (calculado por integración) y el valor de las constantes de acoplamiento *J* (Hz).

Los espectros de masas (EM) fueron realizados por el servicio de Espectrometría de Masas de la Universidad de Sevilla en un espectrómetro *Kratos MS-80-RFA* y en un espectrómetro de masas *Micromass* modelo *AutoeSpec*.

Dimetanosulfonato de dodecan-1,12-diól, **6**



A una suspensión de 1,12-dodecanodiol (25,00 g, 0,12 mol, 1,0 equiv.) y NEt_3 (44,8 mL, 0,32 mol, 2,6 equiv.) en CH_2Cl_2 (70 mL) bajo atmósfera de argón y a 0°C se añade gota a gota cloruro de metanosulfonilo (23,9 mL, 0,31 mol, 2,5 equiv.). Tras agitar durante 5 h a 0°C , la reacción se trata con solución saturada de NH_4Cl (50 mL) y se extrae con CH_2Cl_2 (4x50 mL). Los residuos orgánicos se secan sobre Na_2SO_4 anhidro y se evapora a vacío. Se obtienen 45,25 g (128,00 mmol) de **6** como un sólido amarillo de una alta pureza que se utiliza en la siguiente reacción sin necesidad de purificar.

Rdto. cuantitativo

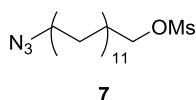
p.f.: 85°C

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ 4,22 (t, J : 6,6 Hz, 4H), 2,99 (s, 6H), 1,77–1,72 (m, 4H), 1,40–1,38 (m, 4H), 1,31 – 1,28 (m, 12H).

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ 70,3 (2C), 37,5 (2C), 29,1 (2C), 29,3 (2C), 29,5 (4C), 25,6 (2C).

EMAR: calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{30}\text{O}_6\text{NaS}_2$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 381,1376; encontrado 381,1364 (- 3,2250 ppm)

Metanosulfonato de 12-azidododecilo, **7**



A una disolución del producto dimesilado **6** (45,00 g, 0,12 mol, 1,0 equiv.) en DMF (200 mL) a temperatura ambiente, se añade azida sódica (8,00 g, 0,12 mol, 1,0 equiv.). Tras 6 h en agitación, se adicionan 200 mL de agua a la reacción y se extrae con CH_2Cl_2 (6x100 mL). La fase orgánica se lava con solución saturada de NaCl (200 mL) y se evapora a vacío. El crudo de reacción se purifica mediante cromatografía en columna con una mezcla de AcOEt/Hex en proporción 1:8 rindiendo 13,48 g de **7** (45,00 mmol) como un líquido amarillo.

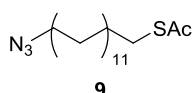
Rdto.: 36%

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ 4,18 (t, J : 6,6 Hz, 2H), 3,22 (t, J : 7,0 Hz, 2H), 2,96 (s, 3H), 1,71 (q, J : 6,7 Hz, 2H), 1,56 (q, J : 6,9 Hz, 2H), 1,39 – 1,25 (m, 16H)

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ 70,3, 51,5, 37,3, 29,4 (3C), 29,2, 29,1, 29,0, 28,8, 26,7, 25,4.

EMAR: calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_{27}\text{O}_3\text{N}_3\text{NaS}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 328,1665; encontrado 328,1666 (0,2513 ppm)

Tioacetato de 12-azidododecilo, **9**



A una disolución de **7** (9,57 g, 31,33 mmol, 1,0 equiv.) en DMF (70 mL) se añade tioacetato de potasio (4,29 g, 37,60 mmol, 1,2 equiv.) poco a poco y a temperatura ambiente. La reacción se deja agitar durante toda la noche, se añade agua (70 mL) y se extrae con CH₂Cl₂ (3x50 mL). Los residuos orgánicos se lavan con solución saturada de NaHCO₃ y solución saturada de NaCl, se secan sobre Na₂SO₄ anhidro y se evapora el disolvente a vacío. Se obtienen 8,93 g (31,32 mmol) de **9**, como un líquido marrón oscuro que se utiliza en la siguiente reacción sin necesidad de purificar.

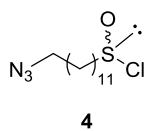
Rdto. cuantitativo

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 3,25 (t, *J*: 7,0 Hz, 2H), 2,86 (t, *J*: 7,4 Hz, 2H), 2,31 (s, 3H), 1,62-1,53 (m, 4H), 1,36-1,26 (m, 16H)

¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ 196,1, 51,6, 30,7, 29,6 (4C), 29,3 (2C), 29,2, 29,0, 28,9, 26,9.

EMAR: calculado para C₁₄H₂₇ON₃NaS [M+Na]⁺: 308,1767; encontrado 308,1757 (-3,1875 ppm)

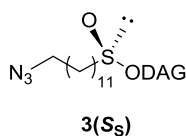
(±)-Cloruro de 12-azidododecano-1-sulfinilo, **4**



A una mezcla del tioacetato **9** (0,33 g, 1,16 mmol, 1,0 equiv.) y anhídrido acético (0,11 mL, 1,16 mmol, 1,0 equiv.) bajo atmósfera de argón y a -10°C, se añade gota a gota cloruro de sulfurilo (0,2 mL, 2,31 mmol, 2,0 equiv.). La mezcla de reacción se agita durante 45 min a -10°C y otros 45 min a -5°C. Transcurrido ese tiempo, se coevapora con tolueno y el residuo se seca a vacío. El crudo del cloruro de sulfinilo (0,31 g, 1,15 mmol) obtenido se pone bajo argón y se usa inmediatamente para la preparación del éster sulfinílico, sin purificación previa.

Rdto. Cuantitativo

(S)-12-azido-dodecanosulfinato de 1,2:5,6-Di-O-isopropiliden-α-D-glucofuranosilo, **3(S_s)**



Sobre una disolución de DAG (0,1 g, 0,39 mmol, 1,0 equiv.) y DIPEA (0,1 mL, 0,08 g, 0,62 mmol, 1,6 equiv.) en tolueno (9 mL) y CH₂Cl₂ (1 mL), a -78°C y bajo atmósfera argón, se añade cloruro de sulfinilo **4** (0,59 mmol, 1,5 equiv.). Tras agitar durante 2h a esta misma temperatura, se añade disolución acuosa de HCl 10% y se extrae con AcOEt (6x20 mL). Los extractos orgánicos se lavan sucesivamente con disolución saturada de HCl 10% (3x30 mL), solución saturada de NaHCO₃ (3x30 mL) y solución saturada de NaCl (3x30 mL) y se secan sobre Na₂SO₄ anhidro. El disolvente se evapora a vacío obteniendo

Parte experimental

una mezcla de los dos ésteres sulfinílicos diastereoisómeros en proporción 96:4. Tras purificación por cromatografía en columna usando 2-propanol/Hex en proporción 30:1 como eluyente, se aísla el sulfonato de configuración *S* en el azufre como diastereoisómero mayoritario (ed: 92%). Se obtienen 0,16 g (0,32 mmol) de **3(S_s)** como un aceite amarillo.

Rto.: 82%

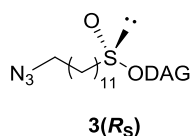
$[\alpha]_D^{20}$: -12,0 (c 1, cloroformo)

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ 5,88 (d, *J*: 3,7 Hz, 1H), 4,73 (d, *J*: 2,6 Hz, 1H), 4,58 (d, *J*: 3,7 Hz, 1H), 4,30 – 4,25 (m, 1H), 4,09 – 4,06 (m, 1H), 4,04 (s, 1H), 4,00 (dd, *J*: 8,5 Hz – 4,9 Hz, 1H), 3,24 (t, *J*: 6,95 Hz, 3H), 2,84-2,71 (m, 2H), 1,58 (q, *J*: 7,0 Hz, 4H), 1,49 (s, 3H), 1,41 (s, 4H), 1,30 (t, *J*: 14,8, 25H)

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ 112,8, 105,3, 84,1, 83,1, 80,3, 67,9, 64,6, 57,6, 51,7 31,0, 29,6 (2C), 29,5, 29,4 (2C), 29,3 (2C), 29,2, 29,0, 28,8, 28,7, 26,9 (2C), 26,5, 21,1

EMAR: calculado para $\text{C}_{24}\text{H}_{43}\text{O}_7\text{N}_3\text{NaS}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 540,2714; encontrado 540,2701 (- 2,4262 ppm)

(*R*)-12-azido-dodecanosulfonato de 1,2:5,6-Di-*O*-isopropiliden- α -D-glucofuranosilo, **3(R_s)**



Sobre una disolución de DAG (0,91 g, 3,50 mmol, 1,0 equiv.) y piridina (0,7 mL, 8,80 mmol, 2,5 equiv.) en THF (10 mL) a -78°C y bajo atmósfera argón, se añade cloruro de sulfinilo **4** (5,30 mmol, 1,5 equiv.). Tras agitar durante 2h a esta misma temperatura, se añade disolución acuosa de HCl 10% y se extrae con AcOEt (4x100 mL). Los extractos orgánicos se lavan sucesivamente con disolución acuosa de HCl 10% (8x 100 mL), solución saturada de NaHCO_3 (8x100 mL) y solución saturada de NaCl (4x100 mL) y se secan sobre Na_2SO_4 anhidro. El disolvente se evapora a vacío obteniendo una mezcla de los dos ésteres sulfinílicos diastereoisómeros en proporción 90:10. Tras purificación por cromatografía en columna usando tolueno/metanol en proporción 90:1 como eluyente, se aísla el sulfonato de configuración *S* en el azufre como diastereoisómero mayoritario (ed: 80%). Se obtienen 1,54 g (2,98 mmol) de **3(R_s)** como un aceite amarillo.

Rdto.: 85%

$[\alpha]_D^{20}$: - 7,9 (c 1, cloroformo)

^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 5,90 (d, J : 3,5 Hz, 1H), 4,77 (d, J : 3,5 Hz, 1H), 4,70 (d, J : 1,9 Hz, 1H), 4,14 – 4,08 (m, 3H), 4,01 – 3,96 (m, 1H), 3,24 (t, J : 6,9 Hz, 3H), 2,88 – 2,71 (m, 3H), 1,74 – 1,69 (m, 3H), 1,61 – 1,54 (m, 3H), 1,50 – 1,49 (m, 4H), 1,42 – 1,26 (m, 20H).

^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ 112,5, 109,6, 105,5, 84,0, 83,2, 81,1, 72,3, 67,9, 58,1, 51,6, 31,0, 29,6 (2C), 29,5, 29,4 (2C), 29,3 (2C), 29,0 (2C), 27,0 (2C), 26,9, 26,4, 25,5, 21,2.

EMAR: calculado para $\text{C}_{24}\text{H}_{43}\text{O}_7\text{N}_3\text{NaS}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 540,2714; encontrado 540,2699 (- 2,7888 ppm)

Síntesis de metil sulfóxidos.

Procedimiento general.

A una disolución del sulfinato de DAG correspondiente (1,0 equiv.) en tolueno anhidro a 0°C se le añade una disolución de bromuro de metil magnesio en THF 1,4 M (1,5 equiv.) y la mezcla de reacción se agita durante 1h a esa misma temperatura. Transcurrido ese tiempo, se añade solución acuosa saturada de NH_4Cl . La fase acuosa se extrae con CH_2Cl_2 . Los extractos orgánicos se secan sobre Na_2SO_4 anhidro y se concentran. El residuo obtenido se purifica por cromatografía en columna con mezcla de disolventes Hex/2-propanol, 10:1

(R)-(-)- 12-Azido-1-dodecil metil sulfóxido, 2(R)

Se obtiene siguiendo el procedimiento general a partir de **3(S_s)** (0,80 g, 1,54 mmol) en tolueno (5 mL) y bromuro de metilmagnesio 1,4 M (1,7 mL, 2,31 mmol). Tras purificación, se obtienen 0,37 g (1,36 mmol) de **2(R)** como un sirupo amarillo (ee \geq 92%)

Rdto.: 88%

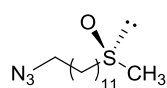
$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: - 31,2 (c 1, cloroformo)

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ 3,24 (t, J : 7,0 Hz, 2H), 2,75–2,61 (m, 2H), 2,55 (s, 3H), 1,77–1,71 (m, 2H), 1,58 (q, J : 7,0 Hz, 2H), 1,51–1,32 (m, 2H), 1,25 (d, J : 10,5 Hz, 14H)

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ 54,6, 51,6, 38,7, 29,6 (2C), 29,5, 29,4, 29,3, 29,2, 28,9 (2C), 26,8, 22,7.

EMAR: calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{NaOS}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 296,1875; encontrado 296,1758.

(S)-(+)-12-Azido-1-dodecil metil sulfóxido, 2(S)



Se obtiene siguiendo el procedimiento general a partir de **3(R_S)** (0,19 g, 0,37 mmol) en tolueno (2 mL) y bromuro de metilmagnesio 1,4 M (0,4 mL, 0,55 mmol). Tras purificación, se obtienen 0,09 g (0,32 mmol) de **2(S)** como un sirupo incoloro (ee≥80%) de iguales características espectroscópicas que su enantiómero.

Rdto.: 87%

$[\alpha]_D = + 27.7$ (c 0,50, cloroformo)

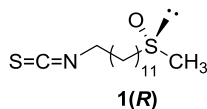
EMAR: calculado para C₁₃H₂₇ON₃NaS [M+Na]⁺: 296,1767; encontrado 296,1769 (0,6534 ppm)

Síntesis de isotiocianatos

Procedimiento general

A una disolución del azido derivado correspondiente (1,0 equiv.) en éter se añade trifenilfosfina (1,9 equiv.) y tras calentar a reflujo durante 3h, se evapora el disolvente y tras añadir disulfuro de carbono al residuo obtenido, se calienta a reflujo durante 1h. Transcurrido este tiempo se evapora el disolvente a vacío. El crudo obtenido se purifica por cromatografía en columna con una mezcla de disolventes hexano/2-propanol 9:1

(R)-(-)-12-Isotiocianato-1-dodecil metil sulfóxido, 1(R)



Se prepara siguiendo el procedimiento general a partir de **2(R)** (0,064 g, 0,23 mmol) en éter (4 mL), trifenilfosfina (0,12 g, 0,44 mmol) y disulfuro de carbono (3,5 mL, 57,90 mmol). Tras la purificación se obtienen 0,062 g de **1(R)** (0,23 mmol) como un sólido de color blanco (ee≥92%).

Rdto. cuantitativo

p.f.: (44-45) °C

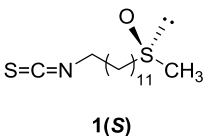
$[\alpha]_D^{20}$: - 29,6 (c 1, cloroformo)

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 3,50 (t, J: 6,6 Hz, 2H), 2,81 – 2,75 (m, 1H), 2,70 – 2,64 (m, 1H), 2,60 (s, 3H), 1,79 – 1,72 (m, 2H), 1,71 – 1,66 (m, 2H), 1,56 – 1,39 (m, 4H), 1,35 – 1,25 (m, 12H).

¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ 54,9, 45,3, 38,6, 30,2, 29,6 (2C), 29,5 (2C), 29,4, 29,0 (2C), 26,7, 22,8.

EMAR: calculado para $C_{14}H_{27}ONNaS_2$ $[M+Na]^+$: 312,1426; encontrado 312,1418 (-2,6295 ppm)

(S)-(+)- 12-Isotiocianato-1-dodecil metil sulfóxido, 1(S)


 Se prepara siguiendo el procedimiento general a partir de **2(S)** (0,064 g, 0,23 mmol) en éter (4 mL), trifenilfosfina (0,12 g, 0,44 mmol) y disulfuro de carbono (3,5 mL, 57,90 mmol). Tras la purificación se obtienen 0,062 g de **1(S)** (0,23 mmol) como líquido marrón (ee≥80%) de iguales características espectroscópicas que su enantiómero.

Rdto: cuantitativo

$[\alpha]_D^{20}$: +25,7 (c 1, cloroformo)

EMAR: calculado para $C_{14}H_{27}ONNaS_2$ $[M+Na]^+$: 312,1426; encontrado 312,1425 (-0,4037 ppm).

7. BIBLIOGRAFÍA

- Ambrosone CB, McCann SE, Freudenheim JL, Marshall JR, Zhang Y, Shields PG. Breast cancer risk in premenopausal women is inversely associated with consumption of broccoli, a source of isothiocyanates, but is not modified by GST genotype. *J Nutr.* 2004; 134(5): 1134-1138.
- Beal MF. Therapeutic approaches to mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* 2009; 15(3): 189-194.
- Beecher CW. Cancer preventive properties of varieties of *Brassica oleracea*: a review. *Am J Clin Nutr.* 1994; 54(5): 1166S.
- Beyer TA, Xu W, Teupser D, Bugnon P, Hildt E, Thiery J. Impaired liver regeneration in Nrf2 knockout mice: role of ROS-mediated insulin/IGF-1 resistance. *The EMBO Journal.* 2008; 27(1): 212-213.
- Bonner WA. Parity violation and the evolution of biomolecular homochirality. *Chirality.* 2000; 12(3): 114-126.
- Branch SK. *Chiral Separation Techniques. A Practical Approach.* 2ªEd. Weinheim: Wiley-VCH; 2001.
- Caldwell J. Through the looking glass in chiral drug development. *Modern Drug Discov.* 1999; 2(4): 51-60.
- Campos MP, Hassan BJ, Riechelmann R, Del Giglio A. Cancer-related fatigue: A review. *Rev. Assoc. Med. Bras.* 2011; 57: 211–219.
- Carlsson E, Lindberg P, Von Unge S. Two of a kind. *Chem Br.* 2002; 38(5): 42-45.
- Chiao JW, Chung FL, Kancherla R, Ahmed T, Mittelman A, Conaway CC. Sulforaphane and its metabolite mediate growth arrest and apoptosis in human prostate cancer cells. *Int J Oncol.* 2002; 20(3): 631-636.
- Choi W, Choi BT, Lee WH, Choi, YH. Sulforaphane generates reactive oxygen species leading to mitochondrial perturbation for apoptosis in human leukemia U937 cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2008; 62(9): 637–644.

- Chung FL, Conaway CC, Rao CV, Reddy BS. Chemoprevention of colonic aberrant crypt foci in Fischer rats by sulforaphane and phenethyl isothiocyanate. *Carcinogenesis*. 2000; 21(12): 2287.
- Clarke JD, Hsu A, Yu Z, Dashwood RH, Ho E. Differential effects of sulforaphane on histone deacetylases, cell cycle arrest and apoptosis in normal prostate cells versus hyperplastic and cancerous prostate cells. *Mol. Nutr. Food Res*. 2011; 55(11): 999-1009.
- Conaway CC, Yang YM. Isothiocyanates as cancer chemopreventive agents: their biological activities and metabolism in rodents and humans. *Curr Drug Metab*. 2002; 3(3): 233.
- Cornblatt BS, Ye L, Dikova-Kostova AT, Erb M, Fahey JW, Singh NK *et al*. Preclinical and clinical evaluation of sulforaphane for chemoprevention in the breast. *Carcinogenesis*. 2007; 28(7): 1485.
- Dash PK, Zhao J, Orsi SA, Zhang M, Moore AN. Sulforaphane improves cognitive function administered following traumatic brain injury. *Neurosci. Lett*. 2009; 460(2): 103-107.
- Delgado A, Minguillón C, Joglar J. Introducción a la síntesis de fármacos. Madrid: Síntesis; 2002.
- Elhalem E, Recio R, Werner S, Lieder F, Calderón-Montano JM, López-Lazaro M *et al*. Sulforaphane homologs: Enantiodivergent synthesis of both enantiomers, activation of the Nrf2 transcription factor and selective cytotoxic activity. *Eur. J. Med. Chem*. 2014; 87: 552-563.
- Eriksson T, Bjorkman S, Roth B, Fyge A, Hoglund P. Stereospecific determination, chiral inversion in vitro and pharmacokinetics in humans of the enantiomers of thalidomide. *Chirality*. 1995; 7(1): 44-52.
- Fahey JW, Haristoy X, Dolan PM, Kensler TW, Scholtus I, Stephenson KK *et al*. Sulforaphane inhibits extracellular, intracellular, and antibiotic-resistant strains of *Helicobacter pylori* and prevents benzo[a]pyrene-induced stomach tumors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99(11): 7610-7615.
- Fahey JW, Zhang Y, Talalay P. Broccoli sprouts: an exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997; 94(19): 10367.

- Fenwick GR, Heaney RK. Glucosinolates and their breakdown products in cruciferous crops, foods and feeds. *Food Chem.* 1983; 11(4): 249.
- Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Ropero S, Setien F, Ballestar ML *et al.* Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *PNAS.* 2005; 102(30): 10604-10609.
- Gabriel D, Roedl D, Gordon LB, Djabali K. Sulforaphane enhances progerin clearance in Hutchinson-Gilford progeria fibroblasts. *Aging Cell.* 2015; 14(1): 78-91.
- Gao X, Talalay P. Induction of phase 2 genes by sulforaphane protects retinal pigment epithelial cells against photooxidative damage. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 2004; 101(28): 10446-10451.
- Gil V, Macleod AJ. The effects of pH on glucosinolate degradation by a thioglucoside glucohydrolase preparation. *Phytochemistry.* 1980; 19(12): 2547.
- Gordon LB, Kleinman ME, Miller DT, Neuberg DA, Giobbie-Hurder A, Gerhard-Herman M *et al.* Clinical trial of a farnesyltransferase inhibitor in children with Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012; 109(41): 16666-16671.
- Graul A, Sorbera L, Pina P, Tell M, Cruses E, Rosa E *et al.* The Year's New Drugs & Biologics – 2009. *Drug News Perspect.* 2010; 23(1): 7-36.
- Greenwood DR, Comeskey D, Hunt MB, Rasmussen LEL. Chemical communication: Chirality in elephant pheromones. *Nature.* 2005; 438(7071):1097-1098.
- Guerrero-Beltrán CE, Calderón-Oliver M, Martínez-Abundis E, Tapia E, Zarco-Márquez G, Zazueta C *et al.* *Toxicol Lett.* 2010; 199(1): 80-92.
- Hanessian S. *Total Synthesis of Natural Products: the Chiron Approach.* New York: Pergamon Press; 1983.
- Hanlon N, Coldham N, Sauer MJ, Ioannides C. Modulation of rat pulmonary carcinogen-metabolising enzyme systems by the isothiocyanates erucin and sulforaphane. *Chemico-Biological Interactions.* 2009; 177(2): 115-120.
- Hoveyda AH, Evans DA, Fu GC. Substrate-directable chemical reactions. *Chem Rev.* 1993; 93(4): 1307-1370.

- Hsu A, Wong CP, Yu Z, Williams DE, Dashwood RH, Ho E. Promoter de-methylation of cyclin D2 by sulforaphane in prostate cancer cells. *Clinical Epigenetics*. 2011; 3: 1-9.
- Hud SH, Wang JC, Kung HF, Wang JT, Lee WL, Yang YH. Antimicrobial effect of extracts of cruciferous vegetables. *The Kaohsiung journal of medical sciences*. 2004; 20(12): 591-599.
- Hudlicky T. *Organic Synthesis: Theory and Applications*. London: JAI Press; 1993.
- Joseph MA, Moysich KB, Freudenheim JL, Shields PG, Bowman ED, Zhang Y *et al*. Cruciferous vegetables, genetic polymorphisms in glutathione S-transferases M1 and T1, and prostate cancer risk. *Nutr Cancer*. 2004; 50(2): 206-213.
- Juge N, Mithen RF, Traka M. Molecular basis for chemoprevention by sulforaphane: a comprehensive review. *Cell. Mol. Life Sci*. 2007; 64(9): 1105.
- Kelloff GJ, Crowell JA, Steele VE, Lubet RA, Malone WA, Boone CW *et al*. Progress in cancer chemoprevention: development of diet-derived chemopreventive agents. *J. Nutr*. 200; 130(25): 467.
- Khair N, Fernández I, Recio R. Compuestos derivados del sulforafano, método de obtención y su uso médico, alimenticio y cosmético. WO 132124 A1. 2013.
- Khair N, Werner S, Mallouk S, Lieder F, Alcudia A, Fernández I. Enantiopure Sulforaphane Analogues with Various Substituents at the Sulfinyl Sulfur: Asymmetric Synthesis and Biological Activities. *J. Org. Chem*. 2009; 74(16): 6002-6009.
- Kim MJ, Kim SH, Lim SJ. Comparison of the apoptosis-inducing capability of sulforaphane analogues in human colon cancer cells. *Anticancer research*. 2010; 30(9): 3611-3619.
- Kim SH, Singh SV. D,L-Sulforaphane causes transcriptional repression of androgen receptor in human prostate cancer cells. *Mol Cancer Ther*. 2009; 8(7): 1946-1954.
- Lin HJ, Probst-Hensch NM, Louie AD, Kau IH, Witte JS, Ingles SA *et al*. Glutathione transferase null genotype, broccoli, and lower prevalence of colorectal adenomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1998; 7(8): 647-652.

- Maheo K, Morel F, Langouet S, Kramer H, Le Fe, Ketterer B. Inhibition of cytochromes P-450 and induction of glutathione S-transferases by sulforaphane in primary human and rat hepatocytes. *Cancer Res.* 1997; 57(17): 3649-3652.
- Meeran SM, Patel SN, Tollefsbol TO. Sulforaphane causes epigenetic repression of hTERT expression in human breast cancer cell lines. *PLoS One.* 2010; 5(7): e1145.
- Mislow K. Molecular chirality. *Top Stereochem.* 1999; 22: 1-82.
- Molina P, Alajarin M, Arques A. Convenient improved syntheses of isocyanates or isothiocyanates from amines. *Synthesis.* 1982; 596(7).
- Movassaghi M, Jacobsen EN. Chemistry: The simplest "enzyme". *Science.* 2002; 298(560): 1904-1905.
- Mukherjee PK, Kumar V, Mal M, Houghton PJ. Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomed.* 2007; 14(4): 289-300.
- Myzak M, Dashwood RH. Chemoprotection by sulforaphane: Keep one eye beyond Keap1. *Cancer Lett.* 2006; 233(2): 208-2018.
- Noyan-Ashraf MH, Sadeghinejad Z, Juurlink BHJ. Dietary approach to decrease aging-related CNS inflammation. *Nutr Neurosci.* 2005; 8(2): 101-110.
- Nyengaard JR, Ido Y, Kilo C, Williamson JR. Interactions between hyperglycemia and hypoxia. Implications for diabetic retinopathy. *Diabetes.* 2004; 53(11): 2931-2938.
- Pham NA, Jacobberger JW, Schimmer AD, Cao P, Gronda M, Hedley DW. The dietary isothiocyanate sulforaphane targets pathways of apoptosis, cell cycle arrest, and oxidative stress in human pancreatic cancer cells and inhibits tumor growth in severe combined immunodeficient mice. *Mol Cancer Ther.* 2004; 3(10): 1239-1248.
- Ping Z, Liu W, Kang Z, Cai J, Wang Q, Cheng N *et al.* Sulforaphane protects brains against hypoxic-ischemic injury through induction of Nrf2-dependent phase 2 enzyme. *Brain research.* 2010; 1343: 178-185.
- Piutti MA. Sur une nouvelle espece d'asparagine. *C.R.Acad.Sci.* 1886; 103: 134-137

- Ragheb A, Attia A, Eldin WS, Elbarbry F, Gazarin S, Shoker A. The protective effect of thymoquinone, an anti-oxidant and anti-inflammatory agent, against renal injury: a review. Saudi J Kidney Dis. Transpl. 2009; 20(5): 741-752.

- Recio R. Diseño y síntesis de nuevos sulfóxidos quirales de interés terapéutico: antagonistas de los receptores NK-1 y análogos del fitoquímico sulforafano. Tesis Doctoral Universidad de Sevilla, 2012.

- Reist M, Carrupt PA, Francotte E, Testa B. Chiral Inversion and Hydrolysis of Thalidomide: Mechanisms and Catalysis by Bases and Serum Albumin, and Chiral Stability of Teratogenic Metabolites. Chem. Res. Toxicol. 1998; 11(12): 1521-1528.

- Renfrey S, Featherstone J. Structural proteomics. market indicators. Nat Rev Drug Discov. 2002; 1(3): 175-176.

- Ritz SA, Wan J, Az-Sánchez D. Sulforaphane-stimulated phase II enzyme induction inhibits cytokine production by airway epithelial cells stimulated with diesel extract. Lung Cell Mol. Physiol. 2007; 292(1): L33-L39.

- Rouhi, AM. Chiral Business. Chem Eng. News. 2003; 81(18): 45-55

- Shalleberger, R. S. Taste recognition chemistry. Pure Appl. Chem. 1997; 69(4): 659-666.

- Skupinska K, Misiewicz-Krzeminska I, Lubelska K, Kasprzycka-Guttman T. The effect of isothiocyanates on CYP1A1 and CYP1A2 activities induced by polycyclic aromatic hydrocarbons in MCF7 cells. In vitro. 2009; 23(5): 763-771.

- Skupinska K, Misiewicz-Krzeminska I, Stypulkowski R, Lubelska K, Kasprzycka-Guttman T. Sulforaphane and its analogues inhibit CYP1A1 and CYP1A2 activity induced by benzo[a]pyrene. J Biochem Mol Toxicol. 2009; 23(1): 18-28.

- Song MY, Kim EK, Moon WS, Park JW, Kim HJ, So HS *et al.* Sulforaphane protects against cytokine and streptozotocin-induced beta-cell damage by suppressing the NF-kappaB pathway. Toxicol Appl Pharmacol. 2009; 235(1): 57-67.

- Spitz MR, Duphorne CM, Detry MA, Pillow PC, Amos CI, Lei L *et al.* Dietary intake of isothiocyanates: Evidence of a joint effect with glutathione S-transferase polymorphisms in lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2000; 9(10): 1017-1020.
- Staudinger H, Meyer J. New organic compounds of phosphorus. III. Phosphinemethylene derivatives and phosphinimines. *Helv. Chim. Acta.* 1919; 2: 635.
- Stephens TD. Reinventing thalidomide. *Chemistry in Britain.* 2001; 37(11): 38-40.
- Singh SV, Warin R, Xiao D, Powolny AA, Stan SD, Silvia D. Sulforaphane Inhibits Prostate Carcinogenesis and Pulmonary Metastasis in TRAMP Mice in Association with Increased Cytotoxicity of Natural Killer Cells. *Cancer Res.* 2009; 69(5): 2117-2125.
- Stinson SC. Chiral chemistry. *Chem Eng News.* 2002; 80: 45-57.
- Stinson SC. Chiral drugs. *Chem Eng News.* 1992; 70(39): 46-79.
- Stinson SC. Chiral drugs interactions. *Chem Eng News.* 1999; 77(41): 101-120.
- Surh YJ. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nature Reviews Cancer.* 2003; 3(10): 768-780.
- Trinh K, Moore K, Wes PD, Muchowski PJ, Dey J, Andrews L *et al.* Induction of the phase II detoxification pathway suppresses neuron loss in *Drosophila* models of Parkinson's disease. *J Neurosci.* 2008; 28(2): 465-472.
- Wittstock U, Halkier BA. Glucosinolate research in the *Arabidopsis* era. *Trends Plant Sci.* 2002; 7(6): 263.
- Woolf TF, Jordan RA. Basic concepts in drug metabolism. *J. Clin. Pharmacol.* 1987; 27(1): 15-17.
- Xu C, Huang MT, Shen G, Yuan X, Lin W, Khor TO *et al.* Inhibition of 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene-Induced Skin Tumorigenesis in C57BL/6 Mice by Sulforaphane Is Mediated by Nuclear Factor E2-Related Factor 2. *Cancer Res.* 2006; 66(16): 8293-8296.
- Xu WS, Parmigiani WB, Marks P.A. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene.* 2007; 26(37): 5541-5552.

- Yanaka A, Fahey JW, Fukumoto A, Nakayama M, Inoue S, Zhang S *et al.* Dietary sulforaphane-rich broccoli sprouts reduce colonization and attenuate gastritis in *Helicobacter pylori*-infected mice and humans. *Cancer Prev Res.* 2009; 4(4): 353-360.

- Zhang SM, Hunter DJ, Rosner BA, Giovannucci EL, Colditz GA, Speizer FE *et al.* Intake of fruits, vegetables, and related nutrients and the risk of non-Hodgkin's lymphoma among women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2000; 9(5): 477-485.

- Zhao H, Lin J, Grossman HB, Hernández LM, Dinney CP, Wu X. Dietary isothiocyanates, GSTM1, GSTT1, NAT2 polymorphisms and bladder cancer risk. *Int J Cancer.* 2007; 120(10): 2208-2213.

- Zhao J, Kobori N, Aronowski J, Dash PK. Sulforaphane reduces infarct volume following focal cerebral ischemia in rodents. *Neurosci. Lett.* 2006; 393(2-3): 108-112.